



ステップ関数型キメラチャネルロドプシンのキネティクス

著者	細島 頌子
号	12
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	生博第296号
URL	http://hdl.handle.net/10097/60334

	ほそしま しょうこ
氏名（本籍地）	細島 頌子
学位の種類	博士（生命科学）
学位記番号	生博第296号
学位授与年月日	平成27年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科，専攻	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）生命機能科学専攻
論文題目	ステップ関数型キメラチャネルロドプシンのキネティクス
博士論文審査委員	（主査） 教授 八尾 寛 教授 谷本 拓 教授 稲葉 謙次

【背景・目的】

チャネルロドプシン 1 および 2 (ChR1, ChR2) は、緑藻類の一種 *Chlamydomonas reinhardtii* において同定された光感受性陽イオンチャネルである。これらは 7 回膜貫通オプシントランスポーターに retinal が共有結合した構造を持ち、青色光を吸収し、all-trans retinal から 13-cis retinal に光異性化することで、チャネルゲートが開き、陽イオンが非選択的に透過する (Nagel et al., 2002, 2003)。ChR2 を神経細胞の細胞膜に発現させ、光を照射すれば、陽イオンが細胞内に流入し、脱分極を引き起こすことができるため、神経の活動を誘引することができる (Boyden et al., 2005; Ishizuka et al., 2006)。ChR2 が発現している細胞のみを刺激することができるため、薬理刺激や電気刺激と比較して空間分解能が高いという優位性があり、オプトジェネティクスは急速に発展・普及した。近年、チャネルロドプシン (ChR) 類は様々な生物種から単離・同定され、また数多くの改変体が作製され、ツールとして広く用いられているが、チャネル自体の構造やイオンチャネルゲート開閉の仕組み、イオン透過のシステム等、光を受容してイオンを透過させる機能が分子のどのような構造に由来するのかといったメカニズムに関しては解明されていない。ChR 自体の構造・機能の研究は、それ自身のメカニズム解明のみならず、より有益なオプトジェネティクスツールの開発につながる。

ChR2 の 128 番目のシステイン (C128)、もしくは 156 番目のアスパラギン酸 (D156) が、アラニン (A) もしくはセリン (S)、トレオニン (T) に置換された改変体は、 τ_{OFF} が非常に長いという特徴を持つので、ステップ関数型チャネルロドプシン (step-function opsin, SFO) と総称されている (Berndt et al., 2009)。ChR2 の C128 および D156 は、DC gate と呼ばれ、retinal とアポタンパク質の相互作用に重要な構造と考えられている。上記の改変体においては、13-cis retinal が安定化することにより、フォトサイクルの一部が遅延したと考えられている (Nack et al., 2012; L renz-Fonfr a and Heberle, 2014)。またステップ関数型 ChR2 では、チャネルの開閉を異なる波長の光を用いることでコントロールすることができる。これらの現象も ChR2 のフォトサイクルと密接に関連しており、これらの改変体は、イオンゲートチャネル開閉のメカニズムやフォトサイクルの詳細を研究に適している。

ChR1 と ChR2 の一部を組み合わせたキメラ ChR として得られた ChRWR/C1C2 および ChRFR は、ChR2 に比べ、膜発現効率が良く、大きな光電流が得られ、脱感作が小さい等の特徴を持つ (Wang et al., 2009)。この ChRWR/C1C2 が現状では唯一、結晶構造解析に成功した ChR である (Kato et al., 2012)。構造解析の結果から、ChRWR/C1C2 でも、C128 および D156 に相同するアミノ酸残基である C167 および D195 が保存され、retinal の近傍に位置づけられていることが示唆されている。しかし、これらのアミノ酸残基の機能については、実験的に精査されていない。そこで本研究では、ChR1 由来の DC gate 部位を持つ ChRWR/C1C2 と、ChR2 由来の DC gate 部位を持つ ChRFR を用いて、DC gate 仮説を検証

することを第 1 の目的とした。また、キメラチャネルロドプシンの DC gate 変異体 (ChRWR/C1C2-C167A および ChRFR-C167A) のキネティクスを定量的に解析・比較し、構造との連関を考察するとともに、キネティクスに基づいた神経活動制御法を提案した。

【方法】

1) ChR2-C128A (128 番目のシステイン(C)をアラニン(A)に置換) および、ChRWR/C1C2-C167A、ChRFR-C167A、ChR2-D156A、ChRWR/C1C2-D195A、ChRFR-D195A を作製し、ND7-23 細胞に発現させ、whole-cell voltage clamp 条件下で光電流の τ_{OFF} を計測した。2) また ChR の活性化(ON)に青色またはシアン色、脱活性化(OFF)に黄色または赤橙色の LED を用い、 τ_{ON} 、 τ_{OFF} の光強度依存性を計測した。3) ラット大脳皮質初代培養を作製し、ChRFR-C167A を発現させ、whole-cell current clamp 条件下で、光刺激の強度および照射時間を変化させ、活動電位を記録した。

【結果】

1) ChR2 に C128A および D195A の変異を加えることにより、 τ_{OFF} は、9,000 倍および 20,000 倍に増大した。キメラ ChR である ChRWR/C1C2-C167A および D195A では、 τ_{OFF} が 2,000 倍から 5,000 倍に増大し、ChRFR-C167A および D195A でも、 τ_{OFF} が 3,000 倍から 6,000 倍に増大した。また生じた光電流は、ChRFR-C167A が比較的大きい傾向が認められた。2) ChR2-C128A および ChRWR/C1C2-C156A、ChRFR-C167A の turning-ON rate および shutting-OFF rate は光強度に依存し、単一光子反応であることが裏付けられた。3) ニューロンに ChRFR-C167A を発現させ、光刺激を行った場合、2 種類の発火パターンを示すニューロン群が認められた。第 1 群では、活動電位惹起に必要な閾値光強度が光照射時間に依存し、照射時間が長いほど閾値が低かった。しかし、第 2 群では、光照射時間が 0.1 秒の場合も、1 秒の場合でも、初めて活動電位の得られる光強度に変化はなかった。

【考察】

1) キメラ ChR の C167 および D195 部位でのアミノ酸置換により、 τ_{OFF} が伸びたことから、DC gate 仮説が、これらのキメラ ChR でも成立することが裏付けられた。また ChRWR/C1C2 と ChRFR では DC gate 部位がそれぞれ ChR1 または ChR2 に由来するが、C167 および D195 への変異の効果に際立った差は見られなかった。DC gate 間および DC gate と他の構造との相互作用に関しては、ChR1 と ChR2 の構造の違いが大きく影響していないことが示唆される。2) またこれらのキメラ ChR の改変体は、その特徴からステップ関数型 ChR として機能し、turning-ON rate および shutting-OFF rate は、それぞれ、光強度の関数として記述された。ゆえに、光電流は光強度と光照射時間の関数として表わされ、ピーク電流に至るのに必要な光強度と光照射時間の関係が推算できる。例えば、青色光の

場合、光強度が 0.1 mWmm^{-2} あれば、0.1 秒程度の照射時間でピーク光電流を得ることができる。光強度が 0.001 mWmm^{-2} しかない場合でも、10 秒程度の光照射時間があれば、ピーク光電流が得られると推測される。 3) さらに 2) で得られた光強度と光照射時間の関係が、ニューロンの発火パターンに及ぼす効果は、ニューロンの膜時定数に依存し、2 種類に分類されることが示唆された。

論文審査結果の要旨

チャネルロドプシン 1 および 2 (ChR1, ChR2) は、緑藻類の一種 *Chlamydomonas reinhardtii* において同定された光感受性陽イオンチャネルである。これらは 7 回膜貫通オプシントランスポーターに retinal が共有結合した構造を持ち、青色光を吸収し、all-trans retinal から 13-cis retinal に光異性化することで、チャネルゲートが開き、陽イオンが非選択的に透過する (Nagel et al., 2002, 2003)。ChR2 を神経細胞の細胞膜に発現させ、光を照射すれば、陽イオンが細胞内に流入し、脱分極を引き起こすことができるため、神経の活動を誘引するツールとして広く用いられている (Boyden et al., 2005; Ishizuka et al., 2006)。しかし、チャネル自体の構造やイオンチャネルゲート開閉の仕組み、イオン透過のシステム等、光を受容してイオンを透過させる機能が分子のどのような構造に由来するのかといったメカニズムに関しては解明されていない。論文提出者は、ChR1 と ChR2 のキメラ体の一つ ChRWR/C1C2 の結晶構造解析において retinal の近傍にあることが分かっている C167 および D195 が、13-cis retinal の安定性に関与するとする仮説 (DC gate 仮説) を実験的に検証した。その結果、C167A および D195A 変異を加えることにより、 τ_{OFF} が 2,000 倍から 5,000 倍に増大し、ChR2 の相同部位の変異と同様の効果が得られることを見出した。また、ChR1 と ChR2 の異なるキメラ体 ChRFR においても、C167A および D195A 変異により、 τ_{OFF} が 3,000 倍から 6,000 倍に増大した。本研究の成果により、DC gate 構造が初めて同定された。また、これらの改変体 (ステップ関数型チャネルロドプシン) の光電流を光強度と光照射時間の関数として定量的に記述した。この光強度と光照射時間の関係が、大脳皮質ニューロンの発火パターンに及ぼす効果を実験的に検証し、膜時定数に依存した 2 種類に分類されることが明らかにした。以上は、論文提出者が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、細島頌子提出の論文は、博士 (生命科学) の博士論文として合格と認める。